

Aus der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend

Direktor: Professor Dr. med. Dr. sc.h.c. Dr. med.vet. h.c.
Dr.med. h.c. Hans Freiherr v. K r e s

Untersuchungen über die Aufnahme von Digitoxin
in die Ehrlich-Aszitestumorzelle

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hannelore Schröder geb. Steindorff
aus Hamburg

1969
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend

Direktor: Professor Dr. med. Dr. sc.h.c. Dr. med.vet. h.c.
Dr.med. h.c. Hans Freiherr v. K r e ß

Untersuchungen über die Aufnahme von Digitoxin
in die Ehrlich-Aszitestumorzelle

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hannelore Schröder geb. Steindorff
aus Hamburg

Dekan: Professor Dr. med. Hans Heinz NAUMANN

Referent: Professor Dr. med. Günter NEUHAUS

Korreferent: Professor Dr. med. Helmut KEWITZ



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 19.3.1969

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
1. Problematik	1
2. Permeabilität biologischer Membranen	5
II. Methodik	9
1. Reagenzien	9
a) Herzglykoside	9
b) Ringer-Bikarbonat-Puffer	9
c) Trispuffer	10
d) Xanthydrol-Reagens	11
2. Nachweismethoden	11
a) Xanthydrol-Reaktion	11
aa) Prinzip	11
bb) Xanthydrol-Eichkurve	12
cc) Beziehung zwischen Digitoxin- Reinsubstanz und Digimerck	13
b) Eiweißbestimmung nach Kjeldahl	14
3. Versuchsanordnung	15
a) Züchtung der Aszitestumorzellen	15
b) Gewinnung des Aszites	15
c) Waschen des Aszites	15
d) Zellsuspension und Inkubation	16
e) Kolorimetrische Bestimmung	16
4. Berechnung der Glykosidzellaufnahme	17
5. Kritische Betrachtung der Versuchsanordnung	18
a) Waschvorgang	18
b) Zellverklumpungen	19
c) Beziehung zwischen Zellzahl und Eiweißgehalt	19
d) Trocknung der glykosidhaltigen Flüssigkeiten	20
e) Verunreinigungen	20
f) Inkubationsdauer	21

6. Weitere Versuchsanordnungen	21
a) Einfluß von K^+ im Außenmilieu	21
b) Einfluß von Ca^{++} im Außenmilieu	22
c) Digitoxin-Zellaufnahme in Abhängig- keit von der Inkubationstemperatur	23
d) Untersuchung der Digitoxinwirkung auf die Zellbeständigkeit	23

III. Ergebnisse	24
1. Aszitestumorzellaufnahme von Digitoxin	24
2. Aufnahme von Digitoxin bei verschiede- nen Inkubationstemperaturen	25
3. Aufnahme von Digitoxin unter K^+ -Einwirkung	26
4. Aufnahme von Digitoxin unter Ca^{++} -Einwirkung	27
5. Wirkung von Digitoxin auf die Atmung von Aszitestumorzellen	28
IV. Diskussion	30
V. Zusammenfassung	38
VI. Literaturverzeichnis	39

I. EINLEITUNG

1. Problematik

Darm-, Herz- und Leberzellen sind neben anderen Zellen des tierischen Organismus für Herzsteroido permeabel. Die bereits von GOTTLIEB (1917)¹⁸ vermutete allgemeine Gewebspenetration gewann durch Digitoxin-Untersuchungen von BINE und Mitarb. (1951)³ an Bedeutung. Die seit WITHERING (1776) bekannte enterale Wirksamkeit der Digitalisblätter galt gleichzeitig als Beweis dafür, daß die Darmzelle für Herzsteroido penetrationsfähig ist. Wie zahlreiche Untersuchungen bereits bewiesen haben, wird die Leberzelle nicht ausschließlich von Geninen - wie früher von CLOETTA (1926)⁸ angenommen -, sondern auch von Glykosiden durchdrungen, wodurch es zum Übertritt in den großen Kreislauf bzw. in die Galle und somit zur Bildung eines enterohepatischen Kreislaufs kommt (z.B. REPKE 1958⁵⁴ und St.GEORGE und FRIEDMAN 1952¹⁶). HARVEY und PIEPER (1955)²⁴ stellten das Eindringen von Digitoxin-C¹⁴ in das Innere von Herzzellen fest. Eine nicht unwesentliche Menge von diesem Digitoxin blieb aber an der Membran gebunden und war abwaschbar. Untersuchungen von OKITA (1957)⁴², FISCHER und Mitarb. (1952)¹¹ mit radioaktivem Digitoxin bzw. Digoxin unterstützten diese Befunde. Autoradiographische Untersuchungen von BRETSCHNEIDER und Mitarbeitern (1962)⁴ mit C¹⁴-Lanatosid C bestätigten insbesondere die erwähnten Arbeiten von HARVEY und PIEPER (1955)²⁴, wobei sie die

Aktivitäten meistens in der Nähe der Zellmembran beobachteten. Schließlich wurde die Herzzellpenetration von Herzsteroiden dank des feineren Verfahrens der Autoradioultramikroskopie endgültig gesichert (BOZZARD und SMITH 1965¹², PELLEGRINI usw. 1966⁴⁸).

Im Gegensatz zur Herzzelle liegen Resorptionsuntersuchungen vor, die Vermutungen über die Art des Penetrationsvorganges der Herzsteroiden durch die Darmzelle erlauben. Insbesondere seit BRODIE und HOGGEN (1957)⁵ kennen wir die Bedeutung der Polarität eines Pharmakons für den Vorgang der Zellpenetration. SCHANKER und Mitarbeiter (1958)⁵⁸ stellten den Ionisationsgrad der Substanz als weiteren Faktor, welcher die Penetration durch die Darmzellmembran beeinflusst, fest. Die Dissoziationskonstante, als pK_a -Wert ausgedrückt ($pH + \log \frac{\text{unionisierte Sre.}}{\text{ionisierte Sre.}}$), würde den erwähnten Aufnahmeprozess wesentlich beeinflussen (SCHANKER 1959)⁵⁷. Spätere Untersuchungen dieser Forschungsgruppe lassen aber darauf schließen, daß sich die Zellmembran des Darmes nicht immer passiv verhält, so daß der Aufnahmeprozess auch von ihr mitbestimmt werden kann (SCHANKER und TOCCO 1960)⁵⁹. SCHEDL und CLIFTON (1961)⁶¹ waren nach Untersuchungen an Ratten der Auffassung, daß die Steroide durch die Darmzellmembran diffundieren. Eine Ausnahme scheinen die Herzsteroiden zu bilden. CRANE und Mitarbeiter (1961)¹⁰ beobachteten, daß unter der Herzsteroidwirkung der aktive Transport von Zuckern durch die Darmzelle gehemmt wurde. LAUTERBACH (1965)³⁹ stellte später fest, daß Convallatoxin eine lokale, konzen-

trationsabhängige Hemmung der Aufnahme von Na^+ , Wasser, Glucose und Kalzium in die Darmzelle bedingt. Dabei hatte derselbe Autor (1963)³⁸ bereits nachgewiesen, daß der Penetrationsvorgang von Convallatoxin durch die Darmzelle Gesetzmäßigkeiten (Dosisabhängigkeit) des aktiven Transportes folgt. VOGT (1965)⁷⁰ deutete diese Untersuchungen ebenso und hob die Bedeutung eines aktiven Transportes für den Resorptionsvorgang der Herzglykoside besonders hervor.

Nachdem das Zellpenetrationsvermögen der Herzsteroide als bewiesen gilt, muß das Ziel der darauffolgenden Forschung sein, den Mechanismus dieses Vorganges zu studieren. wie bereits oben erwähnt, liegen bei der Darmzelle Anhaltspunkte vor, die für die Annahme sprechen, daß sich diese Zelle beim Durchdringen vom Herzsteroid nicht passiv verhält. Vielmehr ist daraus zu entnehmen, daß hier ein aktiver Transportmechanismus begrenzter Kapazität zugrunde liegt. Im gegebenen Falle müßte man dann annehmen, daß die Aufnahme von Herzsteroiden in die Zelle von einem bislang unberücksichtigten breiten Faktorenspektrum abhängig ist. Ferner würde die Problematik der kompetitiven Verdrängung neue Wege öffnen, die eventuell dazu beitragen könnten, die bisher ungeklärten Schwankungen in der Resorption und Herzwirksamkeit eines Herzsteroids endgültig zu deuten.

Die Aufgabe dieser Arbeit besteht darin, die Frage zu lösen, ob Digitoxin in Ehrlich-Asziteszellen einwandert und ob

sein Verhalten durch Verschiebungen der Electrolytkonzentrationen im Außenmedium beeinflußbar ist.

Die Wahl der als Modell dienenden Zelle wirft einige Probleme auf. Die Verwendung von Epithel- oder Muskelzellen für die folgenden Untersuchungen stößt auf technische Schwierigkeiten, da sich Zellsuspensionen von diesen Zellen nicht herstellen lassen. Die Aszitestumorzellen sind dagegen leicht zu züchten, aufzuschwemmen und sind ebenfalls kernhaltig. Als Nachteil ist jedoch in Kauf zu nehmen, daß es sich nicht um normalerweise im menschlichen Organismus vorkommende Zellen handelt. Dennoch ist die praktische Bedeutung der bei ihrer Anwendung erhobenen Ergebnisse mehrmals bewiesen worden. Zum Studium des Zuckertransportes sind mehrfach die Asziteszellen als Versuchsobjekt herangezogen worden. Die hiermit erhobenen Befunde lassen im wesentlichen dieselben Rückschlüsse wie bei Anwendung anderer Zellpopulationen zu (Übersicht bei HELMREICH 1960)²⁹. CHRISTENSEN und Mitarbeiter (1952)⁷, CHRISTENSEN (1960)⁶, RABINOVITZ und Mitarbeiter (1954⁵² und 1956⁵³), ebenso wie HEINZ (1954)²⁵, PAINE und HEINZ (1960)⁴⁴ und HEINZ (1961)²⁶ untersuchten die Aufnahme von Aminosäuren, insbesondere von Glycin in die Aszitestumorzellen. Sie stellten den aktiven Transport fest, bewiesen die kompetitive Verdrängung von Aminosäuren untereinander, von Aminosäuren durch Kalium und zeigten die Förderung der Transportvorgänge durch Hormone. Spätere Untersuchungen haben gezeigt, daß die hier festgestellten Ergebnisse auf normale

Zellen zu übertragen sind. Es sollen hier nur die Untersuchungen von GÜNTHER und WINKELMANN (1961)²² mit den Vogelerythrocyten, die von SPENCER und Mitarbeitern (1962)²⁴ und HAGIHIRE und Mitarbeitern (1962)²³ mit Darmzellen, die von NEAME (1961)⁴¹ mit Hirnzellen und die von RUSZKOWSKI und Mitarbeitern (1962)⁵⁶ mit Nierenmaterial zitiert werden.

2. Permeabilität biologischer Membranen

Das Durchtrittsvermögen von Stoffen durch Zellmembrane hängt zuerst von den Löslichkeitseigenschaften der betreffenden Substanz ab. Nach OVERTON (1959)⁴³ besteht eine weitgehende Parallelität zwischen der Durchlässigkeit der Grenzflächen für viele Stoffe und deren Löslichkeit in Lipoiden bzw. in lipophilen Lösungsmitteln. Unter den nicht seltenen Ausnahmen ist Glucose hervorzuheben. Außerdem spielt die Zelle selbst eine aktive Rolle in diesem Aufnahmevergange. Neben der Pynocytose sind zwei weitere Durchtrittsmechanismen zu berücksichtigen. Die Diffusion folgt den Gesetzen des Fickschen Prinzips, nach dem die Diffusionsgeschwindigkeit, d.h. die Menge Substanz, die eine Querschnittsfläche in einer unendlich kurzen Zeitspanne passiert, der Querschnittsfläche und dem Konzentrationsgradienten proportional sein muß (HELMREICH 1960)²⁹. Neben dem passiven findet sich auch der aktive Transport bei fast allen biologischen Membranen wie an den Schleimhäuten, den Drüsenepithelien, an den Begrenzungen der einzelnen Zellen, den sogenannten Zellmembranen, und an den Membranen von subcellulären Orga-

nellen wie Zellkern, Mitochondrien und Mikrosomen (HEINZ 1963)²⁷.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben ergeben, daß sich die Strukturelemente der Membranen verschiedener Zelltypen einander ähneln. Man spricht sogar von einer "unit membrane" (HEINZ 1963)²⁷.

Als aktiv wird ein Transport angesehen: "wenn chemische Stoffwechselenergie in Arbeit gegen das chemische Potentialgefälle umgewandelt wird, d.h. wenn bei der Bewegung eines Teilchens durch eine Membran Kräfte wirksam sind, die sich von der Energie einer in der Transportregion ablaufenden chemischen Reaktion ableiten" (HEINZ 1963)²⁷.

Danach weist der aktive Transport folgende Merkmale auf:

1. Die chemische Energie für den Transport wird aus dem Stoffwechsel der Zelle bezogen.
2. Die in Arbeit umgesetzte Energie aus dem Stoffwechsel wird gegen das chemische Potentialgefälle der bewegten Teilchen wirksam. Mit anderen Worten: die für den Transport treibende Kraft ist nicht aus dem thermodynamischen Potentialunterschied ableitbar.

Stoffwechselprozesse in der Zelle und Transportvorgänge in der Membran sind miteinander verknüpft und beeinflussen sich gegenseitig; der Stoffwechsel stellt also die Energiequelle für den Transport dar. Durch Verminderung der Stoffwechselintensität wird der Transport gehemmt. Nach Untersuchungen von HODGKIN am Riesennerven hemmt 2,4-Dinitrobenzol die oxydative Phosphorylierung und damit die Bildung von energiereichen Phosphaten.

Die Geschwindigkeit des Natrium-Auswärtsstroms aus Riesennervenfaser durch die Fasermembran sinkt dabei in Gegenwart von 2,4-Dinitrobenzol (HODGKIN und KEYNES 1954)³⁰.

Für den Umsatz von Stoffwechselenergie in Arbeit bzw. für den Bergauf-Transport von Stoffen spricht die Konzentrationserhöhung innerhalb einer Zelle durch intrazelluläre Akkumulation im Gegensatz zur intrazellulären Bindung, die keinen Energieaufwand erfordert. Versuche an Bakterien haben gezeigt, daß bei hoher Konzentration eine genügende Anzahl an Bindungspartnern irgendwelcher Art in den Bakterienzellen nicht vorhanden ist (COHEN und MONOD 1957)⁹. In diesem Falle werden die aufgenommenen Stoffe im Inneren der Zellen osmotisch wirksam (SISTROM 1958)⁶³.

Ebenso wie mehrere Diffusionsprozesse miteinander verknüpft sein können, kann es auch zu einer Koppelung zwischen dem aktiven und passiven Transport kommen. Solche Vorgänge spielen sich an den resorbierenden Epithelien ab; so ist z.B. der passive Wassertransport durch die Epithelien der Nierentubuli an den aktiven Transport von Natriumionen gekoppelt (PASSOW 1963)⁴⁷.

Bei dem aktiven Transport von Elektrolytionen ist außerdem zu berücksichtigen, daß es sich nicht um einen einfachen Ein- und Ausstrom durch die Membran über Nettopumpen, sondern um einen sogenannten Austausch von Ionen mit Hilfe von "Austauschpumpen" handelt. Ein Elektrolytion kann nämlich nur dann von außen nach innen transportiert werden,

wenn gleichzeitig ein Ion in umgekehrte Richtung bewegt wird, und zwar auch, wenn aus elektrostatischen Gründen dies nicht unbedingt erforderlich ist (HEINZ 1963)²⁷. HEINZ beobachtete ähnliche Effekte für den Kaliumtransport in Ehrlich-Aszitestumorzellen. Die Aufnahme von Kalium in diese Zellen wird stark gefördert, wenn das intrazelluläre Kalium durch Natrium ersetzt wird (HEINZ und Mitarbeiter 1961)²⁸. Es bestehen also zwei miteinander gekoppelte aktive Transportsysteme. Man nimmt an, daß dafür ein einziger "Carrier" verantwortlich ist, der seine Affinitäten ändert. Die meisten Theorien legen dem aktiven Transport einen Trägermechanismus zugrunde. Die chemische Natur des "Carriers" ist noch völlig unbekannt. Aus Beobachtungen am Verhalten des Substrats und dessen Abhängigkeit vom Stoffwechsel der Zelle schließt man auf das Vorhandensein eines Carriermechanismus. Hinweise dafür sind z.B. die Erscheinungen der Sättigungskinetik, der Spezifität und der kompetitiven Hemmung. Ein Carrier ist damit aber noch nicht bewiesen (HEINZ 1963)²⁷.

II. METHODIK

1. Reagenzien

a) Herzglykoside

Die Reinsubstanz Digitoxin (von der Fa. Merck DAB 6) ist als Steroid in organischen Lösungsmitteln leicht löslich. HEPKÉ gibt zum Lösen von Digitoxin ein Gemisch aus 20% Äthylalkohol, 79,5% physiologischer NaCl und 0,5% Pyridin an. Pyridin ist aber toxisch, so daß dieses Lösungsmittel für die Prüfung der Transportvorgänge an der kernhaltigen Aszitestumorzelle nicht geeignet ist.

Digitoxin liegt in Digimerck^(R) von der Fa. Merck in wässrig-alkoholischer Lösung zur i.v. Injektion vor. Eine Ampulle enthält in 1 ml Lösung 0,25 mg Digitoxin. Für die Durchführung der Versuchsserien wurden aus 1 ml Ampulleninhalt Verdünnungen verschiedener Konzentrationen mit physiologischer NaCl angesetzt.

b) Ringer-Bikarbonat-Puffer

Der Ringer-Bikarbonat-Puffer besteht aus
 20 T. Ringer-Lösung (Fa. B. Braun Melsungen)
 4 T. NaHCO₃-Lösung 1,3%ig (Merck 6329) und
 1 T. Glucose-Lösung 5,54%ig (Merck 8342)

Der Puffer hat einen pH von 8,2. Er wird jeweils frisch vor Gebrauch angesetzt.

c) Trispuffer

Reagenzien: Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck 8382)

HCl (Titrisol^(R), Merck 9970)

Ringer-Lösung (Fa. B. Braun Melsungen)

D(+)-Glucose (Merck 8342)

NaCl-Lösung 5,85%ig

CaCl₂-Lösung 7,03%ig

Die NaCl- und CaCl₂-Lösungen sind in Ampullen aufbewahrt und enthalten in 1 ml 1 mval Na⁺ und Cl⁻ bzw. 1 mval Ca⁺⁺ und Cl⁻.

Der Trispuffer besteht aus:

25,0 ml 0,2 mol Tris-Lösung

8,3 ml 0,2 n HCl und

66,7 ml aqua dest.

Der Puffer hat einen pH-Wert von 8,3, er ist längere Zeit haltbar.

Zum Ansatz des Versuchs setzt sich der Puffer wie folgt zusammen:

90 T. Ringer-Lösung

30 T. Trispuffer und

5 T. Glucose-Lösung 5,54%ig.

Der Puffer hat einen pH-Wert von 8,25. Ihm wird CaCl₂-Lösung in Konzentrationen von 4-32 mval/l zugesetzt; die Kontrolle enthält äquimolare Mengen NaCl.

Dieser Versuchspuffer wird jeweils vor Gebrauch frisch hergestellt.

d) Xanthydrol-Reagens

15 mg Xanthydrol-Substanz werden in 148,5 ml 96%iger Essigsäure und 1,5 ml 32% HCl gelöst. Das Reagens wird durch Rühren gemischt und in einer dunklen Flasche unter Luftabschluß aufbewahrt.

Es ist auf völlige Sauberkeit der Flasche zu achten; Spuren von Wasser oder Schwermetallen oder Stehen unter Luft- und Lichtzutritt zerstören das Reagens. Das Reagens war 8 Tage haltbar.

2. Nachweismethoden

a) Xanthydrol-Reaktion

aa) Prinzip: Das Xanthydrol-Reagens bildet mit 2-Desoxyzuckern ein rotes Farbkomplexsalz (PESEZ, 1952)⁴⁹.

Durchführung der Reaktion: Die Desoxyzucker wurden in dem durch Exsiccieren der zu untersuchenden Versuchs- oder Eichlösung gewonnenen Rückstand bestimmt.

Der Rückstand wurde mit 2 ml Xanthydrol-Reagens versetzt⁺⁾ , eventuell, sofern er nicht gleich in Lösung ging, mit dem

+) Es ist wichtig, darauf zu achten, daß zwischen Zugabe des Reagens und Erhitzen nicht mehr als 10 Min. vergehen, da anderenfalls die Reaktion bei Zimmertemperatur bereits beginnt und damit der molare Absorptionskoeffizient merklich ansteigt (REPKE 1959)⁵⁵.

Ansatz vorsichtig aufgewirbelt und sofort im siedenden Wasserbad 3 Min. gekocht. Anschließend kamen die Röhrchen zur Unterbrechung der Reaktion für 5 Min. in ein Eisbad, dann für 10 Min. in ein Wasserbad von 20°C. Die Extinktion der Lösung wurde im Elko II von der Fa. Zeiss mit dem Filter S 53 E und bei 0,5 cm Schichtdicke gemessen.

Die mittlere Abweichung betrug $\pm 3\%$ ($n = 8$).

bb) Xanthydrol-Eichkurve

Stammlösung: 25 mg Digitoxin wurden in einem Gemisch von 100 ml Chloroform-Äthanol (40:10) gelöst. Ein Aliquot dieser Stammlösung verdünnten wir 1:10 mit Chloroform-Äthanol, so daß 1 ml dieser verdünnten Lösung 25 γ Reinsubstanz enthielt. Zur Aufstellung der Eichkurve wurden 0,2 - 0,3 - 0,4 - und 0,6 ml der verdünnten Lösung getrocknet, so daß die Rückstände 5 - 7,5 - 10 und 15 γ Digitoxin enthielten. Das Eindampfen der Lösungen erfolgte im Trockenschrank bei 37°C in 2 Stunden. (Höhere Temperaturen wurden wegen des Zuckergehaltes nicht zugelassen.)

Nach Abschluß der Xanthydrol-Reaktion und nach Messen der Extinktionen im Elko II bei 0,5 cm Schichtdicke und Filter S 53E trugen wir die Meßwerte im Koordinatenkreuz gegen γ Reinsubstanz auf. Die Abb.1 zeigt den geraden Verlauf einer Eichkurve, die am Nullpunkt beginnt.

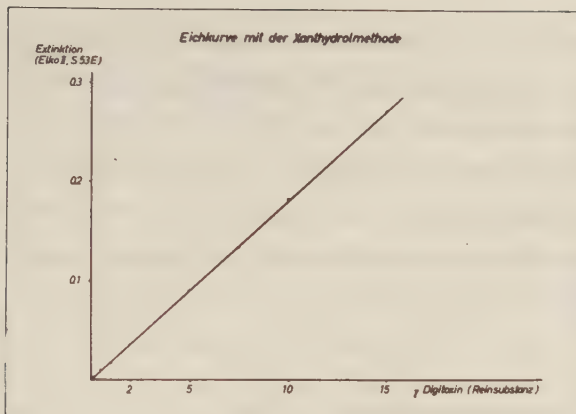


Abb. 1

Wir haben ferner festgestellt, daß oberhalb von 15 μ die Kurve von der Geraden abweicht. Aus diesem Grunde wurde in der Durchführung der Untersuchungen und bei Herstellung der Eichlösungen die Konzentration von 15 μ innerhalb einer Probe nicht überschritten. Bei jeder Auswertung eines Versuchs lief außerdem eine Eichkurve mit.

Zur Festlegung des Filters ermittelten wir das Absorptionsmaximum der Eichlösung im PM QII-Spektralphotometer (Zeiss). Das Absorptionsmaximum lag bei 530 und 540 m μ und entsprach somit dem Filter S 53 E am Elko.

cc) Beziehungen zwischen Digitoxin-Reinsubstanz und Digimerck

Aus Digimerck wurden unter Berücksichtigung der Konzentrationen Eichkurven, wie oben für die Reinsubstanz be-

schrieben, angesetzt. Sie stellten ebenfalls durch den Nullpunkt verlaufende Geraden dar. In der Abb.2 ist die Eichkurve von Digimerck dargestellt. Die Abweichungen der Geraden betragen im Mittel 3,2%; da sie sich nahezu konstant verhalten, wurde für die Auswertung der Versuche das einfachere Verfahren, die Herstellung der Eichkurven aus der Reinsubstanz, vorgezogen.

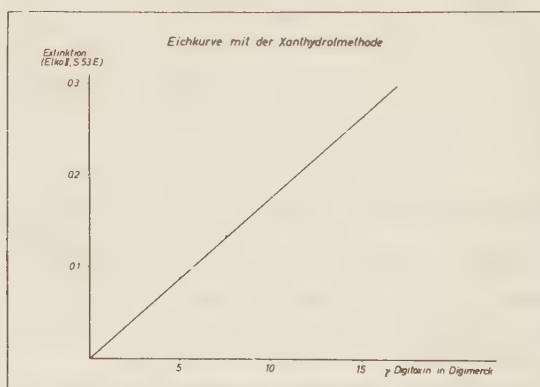


Abb.2

b) Eiweißbestimmung nach Kjeldahl

Den Eiweißgehalt des Inkubationsmaterials ermittelten wir quantitativ mit Hilfe des Kjeldahlverfahrens. Das Prinzip der Methode ist allgemein bekannt und braucht an dieser Stelle nicht eingehend erläutert zu werden. Die mittlere Abweichung der Doppelbestimmungen beträgt $\pm 2,06\%$ ($n = 10$).

3. Versuchsanordnung

a) Züchtung der Ehrlich-Aszitestumorzellen

Zur Züchtung von Ehrlich-Aszitestumorzellen dienten 5 bis 12 Wochen alte, gesunde männliche Mäuse. 0,1 ml eines Aszites, der reichlich Tumorzellen enthält, wurden einer Maus i.p. injiziert; innerhalb kurzer Zeit bildete sich im tierischen Organismus Aszites, der regelmäßig 7 oder 8 Tage nach Beimpfen von der getöteten Maus gewonnen wurde.

b) Gewinnung des Aszites

Nach Decapitieren der Maus und Freipräparierung des Peritoneums entnahmen wir den Aszites mit Hilfe einer Kanüle aus der Bauchhöhle. Die Peritonealhöhle wurde anschließend eröffnet und sowohl Bauchfell als auch Darmschlingen zur Gewinnung weiterer Tumorzellen mit 3 bis 4 ml phys. NaCl umspült. Aszites und Spülflüssigkeit kamen sofort in ein vor-gekühltes Röhrchen.

Die Aszitesflüssigkeit kann farblos-gelblich oder schwach bis stark hämorrhagisch sein. Die jeweils gewonnene Aszitesmenge schwankte zwischen 2 und 6 ml. In allen Versuchen wurde eine Gesamtflüssigkeitsmenge (d.h. Aszites mit Spülflüssigkeit) von 6 bis 8 ml eingehalten.

c) Waschen des Aszites

Den Aszites zentrifugierten wir mit etwa der zweifachen Menge phys. NaCl sofort schonend bei 500 Umdr./Min. 6 Min. lang.

Nach Abzentrifugieren des Überstandes wurde der aus den Zellen bestehende Rückstand mit dem gleichen Volumen Kochsalzlösung unter leichtem Blasen aufgewirbelt und wie oben beschrieben erneut zentrifugiert.

d) Zellsuspension und Inkubation

Aus den gewaschenen Tumorzellen und Ringer-Bikarbonat-Puffer wurde eine homogene Zellsuspension hergestellt. Der Hauptwert erhielt zusätzlich Digitoxin (Digimerck) in gewünschter Konzentration, der Leerwert eine entsprechende Menge phys. NaCl. Beide Proben wurden durch vorsichtiges Schwenken des Inkubationskolbens gemischt und sofort im Inkubator bei 37°C unter Schütteln und Begasen mit einem Gemisch von 95% Preßluft und 5% CO₂ 10 Min. lang inkubiert.

Nach der Inkubation entnahmen wir von Haupt- und Leerwert je ein Aliquot zur Bestimmung der extrazellulären Digitoxinkonzentration, des Gesamtglykosidgehalts und des Eiweißgehalts. Zur Ermittlung des extrazellulären Glykosidanteils kamen die Proben sofort in Eis, um den Incorporationsvorgang zu unterbrechen; zur Messung der Gesamtmenge an Herzglykosid wurde das Inkubationsmaterial in Röhrchen pipettiert, die bereits Methanol zur Zerstörung der Zellen enthielten. Der Eiweißgehalt wurde mit Hilfe des Kjeldahlverfahrens ermittelt. Alle Entnahmen wurden doppelt ausgeführt.

e) Kolorimetrische Bestimmung

Die Versuchsansätze zur Bestimmung der Herzglykoside wurden

nach der Entnahme 5 Min. lang bei 3000 Umdr./Min. zentrifugiert. Die wasserklaren und farblosen Überstände wurden abgemessen, wobei genau gleiche Mengen für Haupt- und Leerwert einzuhalten waren. Die Überstände exsiccieren wir im Vacuum-Trockenschrank bei 35°C. Die Rückstände waren farblos bis gelbbraun, krümelig und kristallisiert. In diesen Rückständen wurden mittels der Xanthidrol-Reaktion die Herzglykoside nach Abzug des Leerwertes quantitativ nachgewiesen.

Wie bereits erwähnt, war zu berücksichtigen, daß die Xanthidrol-Reaktion nur bis zu 15 γ einen linearen Kurvenverlauf zeigt. Um innerhalb dieses Meßbereiches zu bleiben, wurde bei den Bestimmungen im gegebenen Fall mit entsprechenden Verdünnungen gearbeitet.

4. Berechnung der Glykosidzellaufnahme

Die Differenz zwischen dem gesamten und dem extrazellulären Glykosidgehalt ergab den in die Zelle aufgenommenen Anteil. Um den erwähnten Anteil untereinander vergleichen zu können, obwohl jedesmal etwas voneinander abweichendes Ausgangsmaterial durch wechselnde Zellzahl vorlag, wurde der errechnete Glykosidzellanteil auf mg Eiweiß bezogen.⁺⁾

+) Es muß in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, daß die angewandte Methodik es nicht zuläßt, den so errechneten Glykosidanteil als "intrazellulär" zu bezeichnen. Wir haben aber nach Inkubation mit radioaktiv (H^3) markiertem Digoxin in der Konzentration von 25 γ /ml festgestellt, daß 3,8 γ /ml $\pm$ 1,3% in die Asziteszelle aufgenommen wird. Nach Waschen der Zellen (2x mit 20% Äthanol in phys. NaCl) sank dieser Wert auf 0,21 γ /ml $\pm$ 0,01% (HÜSTEN usw. 1968)³². Andere in unserer Abteilung durchgeführte Untersuchungen deuten ferner auf die Tatsache hin, daß der in die Zelle eingedrungene, nicht abwaschbare Digitoxin-Anteil rund 50% der von ihr insgesamt aufgenommenen Menge beträgt.

5. Kritische Betrachtung der Versuchsanordnung

a) Waschvorgang

Die Einflußnahme des vor der Inkubation zur Herstellung der Zellsuspension durchgeführten Waschvorgangs auf die Transportvorgänge war anzunehmen. Sie wurde daher in einer Reihe von Versuchen geprüft. Die Abb.3 zeigt, daß sich beim Waschen mit phys. NaCl bzw. Ringer-Bikarbonat-Puffer und beim Zentrifugieren mit 500 bzw. 2000 Umdr./Min. die Aszitestumorzellen unterschiedlich verhalten. Die Abbildung gibt drei Kurven wieder, die die Abnahme der extrazellulären Glykosidkonzentration von drei Proben über einen Zeitraum von 5 bis 60 Min. aufzeigen. Nach Waschen mit phys. NaCl und Zentrifugieren der Tumorzellen mit 500 Umdr./Min. fiel die extrazelluläre Glykosidkonzentration im Vergleich zu den beiden anderen Behandlungsverfahren als

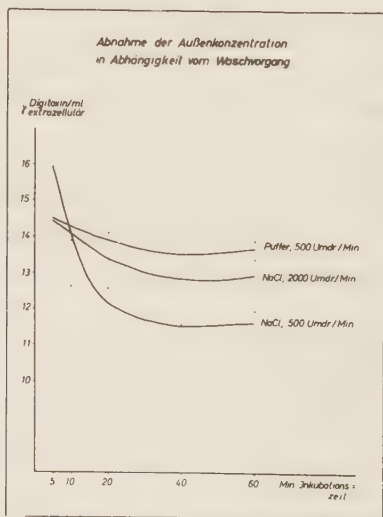


Abb.3

Ausdruck einer besseren Zellaufnahme am steilsten ab. Es wurde daher diese Waschmethode zur Durchführung der Untersuchungen gewählt.

b) Zellverklumpungen

Die Entstehung von Zellverklumpungen während der Inkubation stört verständlicherweise die Aufnahme des Glykosids. Die Herstellung einer homogenen Zellsuspension ohne Verklumpungen erfordert aber besondere Sorgfalt. Das Material verklumpt entweder bereits während des Waschens oder im Inkubator. Der Zusatz eines gerinnungshemmenden Pharmakons wie z.B. Heparin verhindert zwar die Zusammenballung von Zellen, beeinflusst aber möglicherweise auch die Transportvorgänge an der Membran. Verklumpungen innerhalb der Zellsuspension ließen sich meistens vermeiden, wenn folgende drei Punkte beachtet wurden:

- 1) Der Aszites war im Eisbad aufzubewahren.
- 2) Es durften nicht mehr als 20 Minuten zwischen Gewinnen des Aszites und Inkubation verstreichen und
- 3) die Zugabe von phys. NaCl bzw. Puffer zum Zellrückstand mußte schnell und unter leichtem Blasen erfolgen.

c) Beziehung zwischen Zellzahl und Eiweißgehalt

Zur Klärung der Frage des Bezugwertes wurde untersucht, ob eine Beziehung zwischen Zellzahl und Eiweißgehalt der Zellsuspension besteht. Die Abb.4 zeigt eine lineare Abhängigkeit zwischen beiden Komponenten ($r = 0,9956$, $p < 0,001$). Aus diesem Grunde wurde in den vorliegenden Untersuchungen nur das quantitativ genauere Verfahren, die Eiweißbestimmung nach Kjeldahl, durchgeführt.

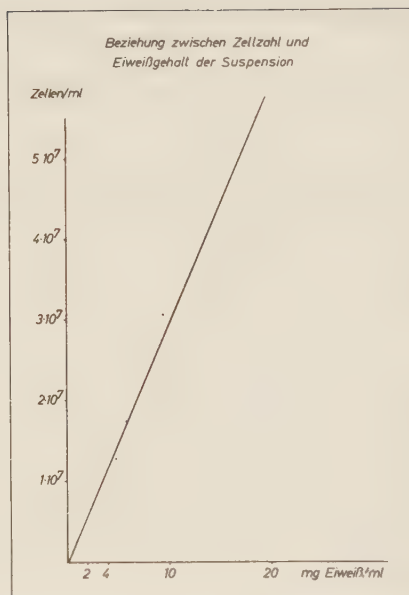


Abb. 4

d) Trocknung der glykosidhaltigen Flüssigkeiten

Das Exsiccieren der glykosidhaltigen Überstände war schwierig. Im gewöhnlichen Trockenschrank dauert das Trocknen der Proben bei Temperaturen von 40° bis 70°C bis zu 8 Tagen. Unter diesen Temperaturen färben sich die Rückstände über einen so langen Zeitraum braun an. Auch das Eindampfen der Proben über konz. H_2SO_4 im Exsiccator bringt keine Vorteile. Erst nach Einengen im Vacuum-Trockenschrank bei 35°C erwiesen sich die Ansätze in gut 24 Std. als trocken und die Rückstände als nahezu farblos.

e) Verunreinigungen

Es bestand die Möglichkeit der Verunreinigung von Proben, die eine Farbabweichung von Versuchs- und Nachlösung

bedingte. Sie machte ein besonders sauberes Arbeiten erforderlich. Verunreinigungsquellen waren z.B. eine nicht einwandfrei saubere Zentrifuge oder ein Trockenschrank, in dem vorher anderes Material verdampft worden war. Bei den Fällen, in denen dennoch eine gegenüber der einherlaufenden Eichkurve nicht korrigierbare Farbabweichung registriert wurde, werteten wir den Versuch nicht aus.

f) Inkubationsdauer

Zur Prüfung der Frage nach einer geeigneten Inkubationsdauer wurde von einem Versuchsansatz nach 5, 10, 20 und 40 Min. Inkubationszeit bei konstanter Temperatur von 37°C und Digitoxin-Konzentration von 20,8 μ /ml ein Aliquot entnommen. Die maximale Zellaufnahme wurde nach 5 und 10 Min. erreicht. Die nach dieser Zeit ermittelten Werte sind ungenau, da nach dieser Inkubationsdauer leicht Zellverklumpungen auftreten können.

6. Weitere Versuchsanordnungen

a) Einfluß von K^+ im Außenmilieu

An Hand mehrerer Versuchsansätze wurde der Einfluß von K-Ionen in der extrazellulären Flüssigkeit auf die Zellaufnahme von Herzglykosiden untersucht. Die K-Ionen wurden dem Ringer-Bikarbonat-Puffer in Form von $KHCO_3$ in Konzentrationen von 2 bis 20 mval/l zugesetzt. Um die gleichen Elektrolytkonzentrationen und damit die Osmolarität des

Puffers im Vergleich zu vorherigen Untersuchungen zu bewahren, wurde der mit KHCO_3 angesetzte Puffer mit einer entsprechend weniger konzentrierten NaHCO_3 -Lösung hergestellt; d.h. die fehlende NaHCO_3 -Menge ersetzten wir durch KHCO_3 . Alle Versuche standen außer der wechselnden K^+ -Konzentration unter den gleichen Voraussetzungen: der Digitoxingehalt der Suspension betrug $16,1 \mu\text{g/ml}$, die Inkubationsdauer 10 Min. und die -Temperatur 37°C .

Bei der Durchführung dieser hier erwähnten Versuchsanordnung lief stets gleichzeitig die Kontrolle mit, die den üblichen NaHCO_3 -Puffer enthielt, im übrigen aber unter genau den gleichen Bedingungen verarbeitet wurde.

Aus dem Quotienten aus der Zellaufnahme unter K^+ -Zusatz zum Puffer und der zugehörigen Kontrolle ohne Kalium ließ sich auf die Einflußnahme der K-Ionen im Außenmilieu auf die Herzglykosid-Zellaufnahme schließen.

b) Einfluß von Ca^{++} im Außenmilieu

Eine ähnliche Abwandlung der Versuchsanordnung, wie sie zur Prüfung des K^+ -Einflusses auf die Transportvorgänge an der Membran vorgenommen wurde, ist für Ca^{++} nicht möglich. Eine Zugabe von Ca^{++} in Form von CaCl_2 zum Ringer-Bikarbonat-Puffer führt bereits in Konzentrationen von $4 \text{ mval } \text{CaCl}_2/\text{l}$ zum Ausfallen von unlöslichem CaCO_3 . Zur Vermeidung des durch Ca-Ionen bedingten Niederschlages wurden daher in einer größeren Versuchsserie Zellsuspensionen mit einem Trispuffer vom pH 8,3 hergestellt.

Die Ca-Ionen-Zusätze zum Trispuffer in Form von wässriger CaCl_2 -Lösung schwankten zwischen 4 und 32 mval/l. Zu jedem Ansatz liefen entsprechende Kontrollen mit, die statt des CaCl_2 die gleiche Konzentration an NaCl enthielten. Alle Untersuchungen standen unter den sonst üblichen Bedingungen.

c) Digitoxin-Zellaufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

Um die Abhängigkeit der Digitoxin-Aufnahme in die Aszites-tumorzelle vom Stoffwechsel der Zelle bzw. von der Temperatur während der Inkubation prüfen zu können, wurden Zellsuspensionen mit einer Digitoxin-Konzentration von 16,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei 8°, 37° und 50°C Außentemperatur 10 Min. lang inkubiert.

d) Untersuchung der Digitoxinwirkung auf die Zellbeständigkeit

Hierfür wurde mit Hilfe der Warburg-Apparatur die Beeinflussung der Zellatmung durch aufsteigende Digitoxin-Konzentrationen untersucht. Die Meßzeit ebenso wie weitere Einzelheiten sind aus der entsprechenden Tabelle zu entnehmen (s. S. 29).

III. ERGEBNISSE

1. Aszitestumorzellaufnahme von Digitoxin

Die Abb.5 zeigt die Zellaufnahme von Digitoxin in Abhängigkeit von der Konzentration des Herzglykosids im Außenmilieu. Auf der Ordinate ist die intrazelluläre Aufnahme in γ /mg Eiweiß, auf der Abszisse die Außenkonzentration in γ /ml Zellsuspension vor der Inkubation aufgetragen.

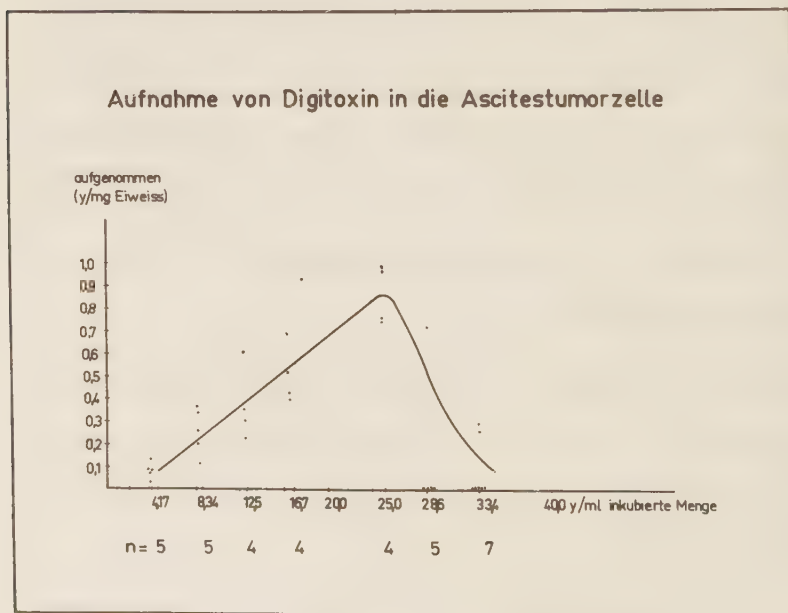


Abb.5

Die Kurve zeigt von 0 bis 25 γ /ml einen geraden, ansteigenden Verlauf, fällt bei 28,6 γ /ml steil ab und verläuft bis zu 33,4 γ /ml konstant auf der Nulllinie.

Bis zu der Außenkonzentration von 25 γ /ml Zellsuspension verhält sich die zelluläre Aufnahme proportional zur Außenkonzentration; von 25,0 bis 33,3 γ /ml ist in 9 von 12 Analysen die extrazelluläre gleich der gesamten Glykosidkonzentration. Eine zelluläre Aufnahme ist in diesem Konzentrationsbereich nur in 3 Fällen zu beobachten.

2. Aufnahme von Digitoxin bei verschiedenen Inkubationstemperaturen

Aus Tabelle 1 ist die zelluläre Aufnahme von Digitoxin in γ /mg Eiweiß bei Inkubationstemperaturen von 8°, 37° und 50°C ersichtlich. Die Mittelwerte zeigen eine deutlich verminderte Aufnahme bei 8°C und eine erhöhte zelluläre Konzentration bei 50°C im Vergleich zu der üblichen Inkubationstemperatur von 37°C.

Tabelle 1

Zellaufnahme von Digitoxin in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

	8°C	37°C	50°C
γ /mg Eiweiß	0,19	0,17	0,56
	0,19	0,41	0,44
	0,28	0,36	0,47
MW	0,22	0,31	0,49

3. Aufnahme von Digitoxin unter K^+ -Einwirkung

Die Abb.6 zeigt den Einfluß der K^+ -Konzentration in der extrazellulären Flüssigkeit auf die Einwanderung von Digitoxin in die Aszitestumorzelle. Auf der Ordinate ist der Quotient Q , auf der Abszisse die K^+ -Konzentration in mval/l angegeben. Der Quotient ergibt sich aus der Aufnahme A von Digitoxin in die Zelle unter K^+ -Einwirkung und der zugehörigen Kontrolle B . Ist Q größer als 1, so spricht man von einer Förderung der Aufnahme von Digitoxin in die Zelle, liegt Q dagegen unter 1, so ist die Aufnahme gehemmt. Die Abb.6 zeigt, daß Q ab 3 mval K^+ /l größer als 1 ist, was für eine durch K^+ bedingte Aufnahmeförderung von Digitoxin spricht.

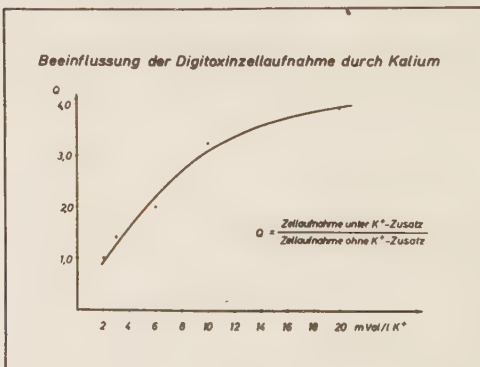


Abb.6

4. Aufnahme von Digitoxin unter Ca^{++} -Einwirkung

In der Abb.7 ist der Verlauf einer Kurve dargestellt, die die Aufnahme von Digitoxin in die Aszitestumorzelle in Abhängigkeit von steigenden Konzentrationen an Ca -Ionen im Außenmedium zeigt. Der Quotient Q , der sich in diesem Fall auf die Aufnahme von Digitoxin in die Zelle in Gegenwart von Ca^{++} und die entsprechende Kontrolle bezieht, ist auf der Ordinate, die vor der Inkubation vorhandene Kalzium-Konzentration im extrazellulären Raum in mval/l auf der Abszisse aufgeführt. Insbesondere bei 4 mval CaCl_2/l liegt der Quotient Q im Sinne einer gesteigerten Aufnahme über 1. Für die Konzentration von 16 bis 32 mval CaCl_2/l liegt Q um 1 herum, die Aufnahme von Digitoxin bleibt hier also unbeeinflusst. Die Mittelwerte und Streuungsbreiten von 4, 8, 16 und 32 mval CaCl_2/l betragen: $2,45 \pm 0,22 - 1,27 \pm 0,45 - 1,01 \pm 0,17 - 1,01 \pm 0,33$.

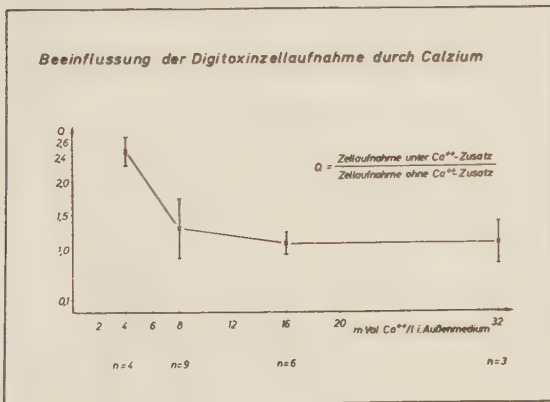


Abb.7

Da aus experimentellen Gründen keine Untersuchungen mit niedrigeren Konzentrationen durchgeführt werden konnten, sind die Kurven der Abb.6 und 7 nicht bis zum Nullpunkt durchgezogen worden. Es ist selbstverständlich, daß die genannten Kurven dort beginnen sollen.

5. Wirkung von Digitoxin auf die Atmung von

Ehrlich-Aszitestumorzellen

Die Ergebnisse aus der Tabelle 2 zeigen, daß Konzentrationen von 4 bis 35 γ Digitoxin/ml keinen sicher meßbaren Effekt im Sinne einer Zellschädigung hervorrufen.

Tabelle 2

Prüfung der Zellatmung in Anwesenheit von Digitoxin

Zeit	Thermo- baro- meter	Thermo- baro- meter	4γ	4γ	25γ	25γ	25γ	25γ	33γ	33γ	33γ
			Digitoxin								
			Nach 2 Min. System geschlossen, nach 5 Min. abgelesen.								
5'			11,3 ⁺	10,5	14,4	11,6	10,8	12,6	9,7	16,4	11,2
10'	16,8	16,5	10,1	9,1	13,2	10,2	10,05	12,1	8,7	16,6	10,4
			Zugabe von Digitoxin								
28'	16,7	16,4	7,4	6,3	11,6	25,6	8,2	11,0	8,1	15,5	9,8
35'	16,6	16,4	3,8	2,8	8,2	22,7	5,5	8,0	5,2	12,8	7,2
43'	16,5	16,3	0,5	-0,5	4,8	19,95	3,6	5,2	2,6	10,0	4,5
			Luft eingelassen und neu eingestellt								
67'	16,5	16,3	20,0	22,0	16,3	19,8	16,8	17,5	19,6	19,65	-
74'	16,5	16,3	17,7	19,4	14,4	18,3	15,6	16,1	18,3	18,4	-
85'	16,5	16,3	14,8	16,4	11,5	16,25	13,8	14,25	16,7	16,6	27,8
96'	16,55	16,3	10,9	12,3	7,9	13,5	11,2	11,4	14,1	14,2	26,7
108'	16,75	16,35	6,9	8,4	4,2	10,7	8,3	8,5	11,5	11,5	24,4

+) Die Werte geben den Stand der Flüssigkeitssäule im System an.

IV. DISKUSSION

Aus der Abb.5 wird ersichtlich, daß bis zu einer Außenkonzentration von $25 \mu\text{g/ml}$ Inkubationsmaterial die Aufnahme von Digitoxin in die Ehrlich-Aszitestumorzellen etwa linear ansteigt, während bei höheren Konzentrationen keine Digitoxin-Einwanderung meßbar ist. Die Tatsache, daß es ab $25 \mu\text{g/ml}$ zu keiner Aufnahme von Digitoxin kommt, spricht nicht dafür, daß die Einwanderung von Digitoxin in die Zelle über eine Diffusion erfolgt.

Handelt es sich dagegen um einen aktiven Transport des Digitoxins, so wäre anzunehmen, daß von einer gewissen Glykosidkonzentration an als Folge einer Sättigung die Aufnahme nicht mehr ansteigt. Das ist jedoch in diesem Fall, wie die Abb.5 (s. S.24) zeigt, nicht der Fall.

Nach den Vorstellungen aus der Enzymkinetik, welche dem sogenannten aktiven Transport zugrunde liegen, gibt es Enzyme, die in ihrer Reaktion mit dem Substrat bei Überschuß des Substrats gehemmt werden. Es wird angenommen, daß sich die Enzym-Substrat-Verbindung mit einem weiteren Substratmolekül verbindet, wobei der gebildete Komplex inaktiv ist und sich gar nicht oder nur langsam zu den Endprodukten spalten läßt. Die Reaktionsgeschwindigkeit kann durch hohe Substratkonzentrationen auf Null gebracht werden. Nach diesem Mechanismus muß beim Auftragen von v (= Geschwindigkeit der Reaktion bzw. Aufnahme von Digitoxin in die Zelle) gegen $\log [S]$ (S = Substrat) eine Glockenkurve entstehen (FRIEDENWALD und Mitarb. 1954)¹³.

Auf Grund vorliegender Befunde erscheint die Annahme berechtigt, daß das Substrat, das Digitoxin, bis zu der Konzentration von 25 γ /ml mit einem Enzym eine Reaktion eingeht, die die Bildung des Reaktionsproduktes und die Aufnahme von Digitoxin in die Zelle zur Folge hat. Unter der Voraussetzung, daß das Enzym einem Träger gleichzusetzen ist, läßt sich die Vermutung äußern, daß es sich im Falle der Digitoxinaufnahme um einen aktiven Transport handelt. Auch die Ergebnisse der bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur durchgeführten Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß die Zellaufnahme von Digitoxin temperaturabhängig ist.

Da die Inkubationstemperatur den Stoffwechsel der Zelle beeinflusst, indem er bei erniedrigter Temperatur gehemmt und bei erhöhter Temperatur gesteigert wird, folgt daraus, daß jeweils entsprechend weniger bzw. mehr Energie zur Verfügung gestellt wird. Der hier erhobene Befund ist ein weiteres Zeichen dafür, daß die Digitoxin-Aufnahme in die Zelle möglicherweise aktiv erfolgen könnte. Die Kriterien, die einen Hinweis für den aktiven Transport geben, sind jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht erschöpfend geprüft worden, so daß sich die Frage, ob es sich um einen aktiven Transport des Digitoxins handelt, nicht sicher bejahen läßt.¹⁾

1) Weitere im Anschluß an diese Arbeit in unserer Abteilung durchgeführte Untersuchungen haben ergeben, daß die Digitoxin-Aufnahme in die Zelle unter N-Begasung geringer ist (HÜSTEN usw. 1968)³².

Das Auftreten einer Hypokaliämie bei der Intoxikation durch Herzsteroidoide und die Herabsetzung ihrer cardialen Wirksamkeit durch Zugabe von Kalium sind klinische Beobachtungen. FRIEDMAN und BINE (1947)¹⁴ stellten an isolierten Herzpräparat unter der Einwirkung von Lanatosid C eine K^+ -Verarmung der Herzzellen fest. Sie machten aber auf die hierfür notwendig hohen Herzsteroid-Konzentrationen aufmerksam. Dieser Befund wurde später von HOTOVY und KÖNIG (1951)³¹ mit dem K-Strophanthin bestätigt. Es muß daher vermutet werden, daß - bei der Annahme, daß diese Befunde auf den Menschen übertragbar sind - die Herzsteroidoide auf die Zellen des exkretorischen Apparates dieselbe Wirkung hervorrufen müssen, um die erwähnte Hypokaliämie bedingen zu können. VARGA, BAGDY und KESZTYÜS (1949)⁶⁹ haben die hypokalämische Wirkung des Digitalis unter experimentellen Bedingungen gesichert. Nach AIKAWA und RHOADES (1955)¹ wäre die durch Herzsteroidoide bedingte Kaliumverarmung des Organismus mit der Cortison-Wirkung zu vergleichen. SCHATZMANN (1953)⁶⁰ stellte mit Erythrocytensuspensionen eine durch Herzsteroidoide hervorgerufene Hemmung der Aufnahme nicht nur des Kaliums, sondern auch des Natriums fest. Anscheinend findet diese Wirkung auch bei der Tubuluszelle statt, da, wie SCHWAB und Mitarbeiter (1955)⁶² feststellten, die durch Digitoxin hervorgerufene Mehrausscheidung von Wasser und Elektrolyten auf eine verminderte Rückresorption und nicht, wie früher angenommen, auf eine Steigerung des Glomerulumfiltrates zurückzuführen ist. PROCTOR, REBAR

und TIGERMAN (1955)⁵¹ stellten fest, daß 2,5 μ g Digitoxin/ml in der Lage sind, Fermentaktivitäten in unterschiedlichem Ausmaß zu hemmen; nämlich die ATP-ase, die Acetylcholinesterase und die Desaminase. Darüber hinaus wiesen PAOLO, GARAGIN und ABBATI (1956)⁴⁶ mit hohen Lanatosid-C-Dosen nach, daß unter ATP-Zugabe eine Schutzwirkung gegen den Herzstillstand zu beobachten ist. GREEFF (1957)¹⁹ fand bei der Ratte mit K-Strophanthin einen Kaliumverlust in der Muskulatur mit Erhöhung ihres Natriumgehaltes, Hyperkaliämie und Hyperkaliurase. Mit Ausnahme des Natriumbefundes und der Hyperkaliämie bei Hyperkaliurase galten diese Untersuchungen als Bestätigung der vorangegangenen Arbeiten. Die von SCHATZMANN (1953)⁶⁰ durchgeführten Untersuchungen mit Erythrocytensuspensionen wurden später von GARDOS (1964)¹⁵ mit dem G-Strophanthin wiederholt. Er stellt ebenfalls eine Hemmung der Kaliumaufnahme fest. GREEFF und Mitarbeiter (1965)²¹ wendeten diese Herzsteroidwirkung als Test zur Konzentrationsbestimmung an. Dieses ist auch das Prinzip der LOEWENSTEINSchen Methode (1965)⁴⁰ mit Rb⁸⁶ zur Bestimmung der Digitaliskonzentration in Erythrocytensuspensionen.

Wie aus der obigen Darstellung hervorgeht, ist die nachgewiesene Hemmung der Kaliumaufnahme in die Zelle durch Herzsteroidoide wie bekannt als Hemmung eines aktiven Transportmechanismus zu deuten. Durch die passive Kaliumabgabe aus der Zelle würde dann die erwähnte Versäuerung auftreten. Nach GREEFF (1963)²⁰ und PORTIUS und REPKE (1963)⁵⁰ ist die

Hemmung des aktiven Kaliumtransportes auf eine spezifische Wirkung des Herzsteroids auf die Membran-ATP-ase zurückzuführen, wodurch ihre Aktivität gehemmt wird. Ihre Untersuchungen gelten als Bestätigung der vorangegangenen Arbeiten von PROCTOR und Mitarbeitern (1955)⁵¹. PALMER und NECHAY (1964)⁴⁵ beobachteten in vitro bei Inkubationen mit Na^+ - K^+ -aktivierter ATP-ase aus Hühneriere, daß niedrige G-Strophanthin-Konzentrationen eine Stimulation, dagegen hohe Mengen eine Hemmung der Aktivität hervorrufen. In vivo stellten sie bei niedrigen Dosen eine Förderung, bei hohen Dosen dagegen eine Hemmung der tubulären Na^+ -, Cl^- - und K^+ -Rückresorption fest. Die Zugabe von Kalium setzte die durch hohe Mengen G-Strophanthin bedingte Hemmung der ATP-ase wieder herauf. Unsere Untersuchungen zeigen, daß bei gleicher Molarität proportional zur K^+ -Außenkonzentration die Digitoxin-Aufnahme in die Zelle zunimmt. Damit scheidet die Vermutung aus, daß sich Kalium und Digitoxin an der Zellmembran kompetitiv verdrängen. Sie verhalten sich daher nicht wie spezifische Antagonisten. Vielmehr fördert Kalium die Aufnahme von Digitoxin in die Zelle. Dieser Effekt des Kaliums ist mit Hilfe der ATP-ase-Hemmungstheorie nicht zu erklären. Wie bereits oben erwähnt, schwächt die Kaliumzugabe die inotrope Wirkung ab (z.B. KEYL usw. 1960)³⁴. Hier haben wir aber unter der Kaliumanreicherung im Außenmedium keine Hemmung, sondern eine vermehrte Digitoxineinwanderung in die Zelle festgestellt. Wenn diese Ergebnisse mit Asziteszellen

auf Herzzellen zu übertragen sind, ist anzunehmen, daß die Einwanderung von Digitoxin in die Zelle in umgekehrter Beziehung zur inotropen Wirkung steht. Einschränkend muß noch dazu erwähnt werden, daß die in unserem Experiment angewandte Konzentration von Digitoxin ($21,9 \times 10^{-3}$ mmol/l) oberhalb der Dosis liegt (10^{-8} mmol/l), die zum inotropen Effekt führt (STOWRING usw. 1966)⁶⁶. Die zuletzt genannten Autoren untersuchten ferner eine gereinigte Myosin-B-Lösung auf ihre Kontraktilität (Superpräzipitation) und auf den ATP-Verbrauch unter G-Strophanthin-Einwirkung. Beide Prozesse sind - wie bekannt - aneinander gekoppelt.

Tatsächlich wurden sie potenziert ab G-Strophanthin-Konzentrationen von 10^{-11} molar. Um eine Hemmung der Kalium-Aufnahme in die Zelle hervorzurufen, sind G-Strophanthin-Konzentrationen höher als 10^{-8} molar notwendig (KAHN und ACHESON, 1955)³³, so daß diese Herzsteroidwirkung von vielen Autoren als extracardial und toxisch angesehen wird (KLAUS, KUSCHINSKY und LÜLLMANN 1962a³⁶ und 1962b³⁷, TUTTLE usw. 1962 u.a.)⁶⁸.

Die Verstärkung der Herzsteroidwirkung auf das Herz durch Ca^{++} ist jedem Kliniker bekannt. Die gleichzeitige Verabreichung von Kalzium und Strophanthin in therapeutischen Dosen kann zum Herzstillstand führen und wird daher allgemein als ärztlicher Kunstfehler angesehen. Auch das Magnesium hat eine solche Wirkung. Durch Kalziumentzug aus der Tyrode-Lösung entsteht beim präparierten Meerschweinchenvorhof eine Herabsetzung seiner Kontraktionskraft.

Ihre Beeinflussung durch Herzsteroidoide wird als Methode zur Mengenbestimmung angewandt. WILBRANDT und CAVIEZEL (1954)⁷¹ stellten im Experiment fest, daß unter K-Strophanthin - im Gegensatz zum Kalium - eine Kalzium-Anreicherung im Herzmuskel auftritt. THOMAS (1960)⁶⁷ bestätigte diese Untersuchungen, führte den registrierten Effekt aber auf eine vermehrte Kalzium-Aufnahme zurück und schränkte die Bedeutung dieser Ergebnisse ein mit der Begründung, daß hierfür hohe K-Strophanthin-Konzentrationen benutzt wurden. Den gleichen Effekt wie beim Ca^{++} fanden AIKAWA und Mitarbeiter (1961)² beim Mg^{28} , wenn die Zellen unter der Einwirkung von Digitoxin standen. GERSMEYER und HOLLAND (1963)¹⁷ fanden, daß K-Strophanthin in hohen Dosen zwar die Nettoaufnahme von Kalzium in die Vorhofzelle steigert, daß aber auch Dosen, die sich im inotropen Bereich befinden, eine Erhöhung der austauschbaren Kalziumfraktion hervorrufen. KLAUS (1963)³⁵ wies außerdem nach, daß zwischen inotroper Wirkung und Einfluß auf den Kalziumaustausch eine dosisabhängige Korrelation besteht. Nach STANLEY und REITER (1964)⁶⁵ ist ferner die durch Glykosid bedingte Wirkung auf die Dauer der Aktionspotentiale des Meerschweinchenpapillarmuskels der Kalziumwirkung gleichgerichtet.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß Ca^{++} in Konzentrationen von 4 bis 8 mval/l die Digitoxin-Aufnahme in die Aszites-tumorzelle fördert. Bei höheren Mengen übt das Ca^{++} - im Gegensatz zum Kalium - keinen Einfluß auf die Glykosideinwanderung aus. Die Zugabe von Ca^{++} ab 16 mval/l hemmt die

Digitoxin-Aufnahme in die Zelle nicht, so daß dieses Elektrolyt bei diesen Konzentrationen keine antagonistische Wirkung aufweist. Die Schlußfolgerung, die aus diesen Ergebnissen zu ziehen wäre, ist lediglich die, daß eine normale Ca^{++} -Konzentration im Außenmedium im Vergleich zu der Kontrolle ohne Ca^{++} die Digitoxin-Aufnahme erhöht. Da wir die quantitativen Ergebnisse, d.h. Digitoxin/mg Zelleiweiß nicht mit denen von Abb.6 vergleichen können (wir haben aus Gründen, die im methodischen Teil der Arbeit dargelegt wurden, einen anderen Puffer benutzt und somit die Versuchsbedingungen geändert), ist eine Interpretation dieser Ergebnisse nur unter Hinzuziehung der mitlaufenden Kontrolle möglich, wenn wir auch eine zur K^{+} - bzw. Ca^{++} -Zugabe äquimolare Menge an Na^{+} entnommen haben, um die Molarität der Außenflüssigkeit nicht zu ändern. Wären die K^{+} - und Ca^{++} -Experimente gleich ausgefallen, so hätten wir einen Grund für die Annahme, daß der registrierte Effekt nicht Folge der Elektrolytzugabe, sondern des Natriumentzugs ist. Dies ist, wie aus den Ergebnissen hervorgeht, nicht der Fall.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Ehrlich-Aszitestumorzellen vermögen Digitoxin aufzunehmen. Dieser Vorgang wird zunächst von der Außenkonzentration des Glykosids positiv beeinflusst. Nach Erreichen eines Aufnahme maximums geht bei steigenden Digitoxinkonzentrationen im Außenmedium die Zellaufnahme dieses Glykosids bis auf Null zurück. Dieser Effekt wird als durch Digitoxin bedingte Eigenhemmung der Aufnahme interpretiert. Eine Beeinflussung der Zellatmung durch die hier infrage kommenden Digitoxinkonzentrationen wurde nicht festgestellt. Die Zellaufnahme von Digitoxin ist ferner von der Inkubationstemperatur abhängig. Steigende Kaliumkonzentrationen im Außenmedium fördern die Zellaufnahme des erwähnten Herzsteroides, während steigende Kalziumkonzentrationen diese hemmen.

Literaturverzeichnis

1. Aikawa, I.K.,
E.L. Rhoades: Effects of digitoxin on exchangeable and tissue potassium contents.
Proc. Soc. exp. Biol. 90, 332-5 (1955)
2. Aikawa, I.K.,
I. Z. Reardon und
D. R. Harms: Effects of digitoxin on exchangeable and tissue contents of magnesium.
Proc. Soc. exp. Biol. 108, 684-6 (1961)
3. Bine, R.,
M. Friedman,
S. O. Byers und
C. Bland: The deposition of digitoxin in the tissues of the rat after parenteral injection.
Circulation 4, 105-7 (1951)
4. Bretschneider, H. J.,
P. Doering,
W. Eger,
G. Haberland,
K. Kochsiek,
H. Mercker,
F. Scheler und
G. Schulze: Arterielle Konzentration, arterio-venöse Differenz im Coronarblut und Organverteilung von C¹⁴-markiertem Lanatosid C nach rascher intravenöser Injektion.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 244, 117-44 (1962)
5. Brodie, B. B.,
C. A. Hogben: Some physico-chemical factors in drug action.
J. Pharm. (Lond.) 9, 345-80 (1957)
6. Christensen, H. N.: Reactive sites and biological transport.
Advanc. Protein Chem. 15, 239-314 (1960)
7. Christensen, H. N.,
T. R. Riggs,
H. Fischer,
I. M. Palatine: Amino acid concentration by free cell neoplasm: relations among amino acids.
J. biol. Chem. 198, 1-15 (1952)
8. Cloetta, M.: Die Darstellung und chemische Zusammensetzung der aktiven Substanzen aus den Digitalisblättern, ihre pharmakologischen und therapeutischen Eigenschaften.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 112, 261-342 (1926)
9. Cohen, G. N.,
J. Monod: Bacterial Permeases.
Bact. Rev. 21, 169-94 (1957)
10. Crane, R. K.,
D. Miller,
J. Bihler: In: Kleinzeller, A. und A. Kotyk: Membran Transport and Metabolism. p. 439 London, New York Academic Press (1961)

11. Fischer, C.S.,
A.Sjoerdsma und
R.Johnson: The tissue distribution and
excretion of radioactive digitoxin.
Circulation 5, 496-503 (1952)
12. Fozzard, H.A.,
J.R.Smith: Observations on the localisation
of tritiated digoxin in myocardial
cells by autoradiography and ultra-
microscopy.
Amer.Heart J. 69, 245-52 (1965)
13. Friedenwald und
Maengwyn-Davies: In: McElroy, W.D. und B.Glass:
A Symposium on the Mechanism
of Enzyme Action, Baltimore (1954),
S.180 (Contribution of the
McCollum-Pratt Institute. 70)
14. Friedman, M.,
R.Bine jr.: Observations concerning the
influence of potassium upon the
action of a digitalis glycoside
(Lanatosid C).
Amer.J.med.Sci. 214, 633-8 (1947)
15. Gárdos, G.: Effect of Ouabain on the Active
Potassium Accumulation.
Experientia 20, 127-8 (1964)
16. St.George, S.,
M.Friedman: The intestinal excretion of
Digitoxin in the rat.
Circulation 6, 851-2 (1952)
17. Gersmeyer, E.F.,
W.C.Holland: Über den Einfluß der Herzfrequenz
auf Strophanthintoxizität,
Calciumgehalt und Calciumaustausch
am Meerschweinchenvorhof.
Klin.Wschr. 41, 103 (1963)
18. Gottlieb, R. Über die Aufnahme der Digitalis-
substanzen in die Gewebe.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.
Path.Pharmak. 82, 1-29 (1917)
19. Greeff, K.: Mineralstoffwechselwirkung und
Toxizität des Strophenthins bei
nebennierenlosen Ratten.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.
Path.Pharmak. 231, 391-400 (1957)
20. Greeff, K.: Zur Pharmakologie der herzwirk-
samen Glykoside.
Klin.Physiologie (aktuelle
Probleme und Übersichten,
G.Thieme-Verlag, Stuttgart)
1, 340-70 (1963)

21. Greeff, K.,
D. Schwarzmann und
G. Wesschulzik:
B-Acetyldigoxin und Digoxin
Vergleichende pharmakologische
Untersuchungen ihrer Wirksamkeit
und enteralen Resorption.
Arzneimittel-Forsch. 15, 483-6
(1965).
22. Günther, Th.,
W. Winkelmann:
Einfluß von Steroidhormonen auf
den aktiven Transport von Glykokoll
in Vogelerythrocyten.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.
Path.Pharmak. 242, 277-83 (1961)
23. Hagihire, H.,
T.H. Wilson,
E.C.C. Lin:
Intestinal Transport of certain
N-saltituted amino acids.
Amer.J.Physiol. 203, 637-40 (1962)
24. Harvey, St.C.,
G.R. Pieper:
Intracellular distribution of
digitoxin-C¹⁴ in the heart.
J.Pharmacol.exp.Ther. 114, 14-27
(1955)
25. Heinz, E.:
Kinetic studies on the influx of
Glycin-1-C¹⁴ into the Ehrlich
mouse ascites carcinoma cells.
J.bio.Chem. 211, 781-90 (1954)
26. Heinz, E.:
Biochemie des aktiven Transports.
12. Colloquium der Gesellschaft
für Physiologische Chemie, Mosbach/
Baden. Springer-Verlag, 166-88
(1961)
27. Heinz, E.:
Physiologie, Biochemie und
Energetik des aktiven Transports.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.
Path.Pharmak. 245, 10-28 (1963)
28. Heinz, E.,
H. Grobecker,
H. Kromphardt:
Studies on the Transport of Alkali
Ions in Ehrlich Ascites Tumor
Cells.
Internat.Biophysics Congr.,
Stockholm 1961, Abstracts, S.172-3
29. Helmreich, E.:
Zuckerttransport in Zellen und
Gewebe. Ein Ort der Stoffwechsel-
kontrolle?
Klin.Physiologie 1, 44-86 (1960)
30. Hodgkin, A.L.,
R.D. Keynes:
Movements of cations during
recovery in nerve.
Symp.Soc.exp.Biol. 8, 423-37 (1954)

31. Hotovy, R.,
W. König: Weitere pharmakologische Studien an der Kaumuskulatur der Ratte. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path. Pharmacol. 213, 177-84 (1951)
32. Hüsten, J.,
H. Schröder,
A. Ruiz-Torres und
G. A. Neuhaus: Aufnahme von Digitoxin in die Ascites (Ehrlich)-Zelle und Wirkung auf den Tyrosin- C^{14} Eiweißeinbau. Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 74 (1968) im Druck
33. Kahn, J. B. jr.,
G. H. Acheson: Effects of cardiac glycosides and other lactones, and of certain other compounds, on cation transport in human erythrocytes. J. Pharmacol. exp. Ther. 115, 305-18 (1955)
34. Keyl, A.,
I. R. Suker,
H. U. Wessel und
P. S. Rhoads: Digitalis antagonism II. A.M.A. Arch. intern. Med. 10 709-26 (1960)
35. Klaus, W.: Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Digitoxinderivate auf die Kontraktionskraft und den Ca-Austausch isolierter Meerschweinchen Vorhöfe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path. 246, 226-39 (1963)
36. Klaus, W.,
G. Kuschinsky und
H. Lüllmann: Über die Wirkung therapeutischer und toxischer Strophanthinkonzentrationen auf den Kalium-Flux und den Kalium- und Natriumgehalt von Herzmuskulatur. Klin. Wschr. 40, 823-4 (1962a)
37. Klaus, W.,
G. Kuschinsky und
H. Lüllmann: Über den Zusammenhang zwischen positiv inotroper Wirkung von Digitoxigenin, Kaliumflux und intrazellulären Ionenkonzentrationen im Herzmuskel. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path. Pharmacol. 242, 480-96 (1962b)
38. Lauterbach, F.: Über Mechanismus und Umfang der enteralen Resorption und den entero-hepatischen Kreislauf von Herzglykosiden. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path. Pharmacol. 245, 67-8 (1963)
39. Lauterbach, F.: Einfluß von Herzglykosiden auf die enterale Resorption. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path. Pharmacol. 250, 232-3 (1965)

40. Loewenstein, J.: A method for measuring plasma levels of Digitalis glycosides. *Circulation* 31, 228-33 (1965)
41. Neame, K.D.: Phenylalanine as Inhibitor of Transport of Amino-Acids in Brain. *Nature* 192, 173-4 (1961)
42. Okita, G.T.: Studies with radioactive digitalis. *Amer. Geriatr. Soc.* 5, 163-74 (1957)
43. Overton: In: Emil Lehnartz: Einführung in die Chemische Physiologie. 11. Aufl. Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, S.181 (1959)
44. Peine, C.M., E.Heinz: The structural Specificity of the Glycin Transport System of Ehrlich Carcinoma Cells. *J.biol.Chem.* 235, 1080-5 (1960)
45. Palmer, R.F., B.R.Nechay: Biphasic renal effects of ouabain in the chicken: correlation with a microsomal $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ stimulated ATP-ase. *J.Pharmacol.exp.Ther.* 146, 92-8 (1964)
46. Paolo, di E., A.Garegin und A.Abbati: Effetti elettrocardiografici e variazioni istologiche da ATPe da digitale in cuore isolato. *Boll.Soc.ital.Cardiol.* 1, 38-40 (1956)
47. Passow, H.: Passive Permeabilität von Zellmembranen. Zur Frage der Penetration durch Poren. *Klin.Wschr.* 41, 130-8 (1963)
48. Pellegrini, A.: Localisation of Digitalis in the human myocardium. Autohisto-radiographic study with the electronmicroscope. *Minerva med.* 57, 528-34 (1966)
49. Pesez, M.M.: Le xanthidrol, réactif des desoses. *Ann.pharm.franç.* 10, 104-8 (1952)
50. Portius, H.J., K.Repke: Versuche zur Charakterisierung einer Transport-ATP-ase für Na^+ und K^+ in der Zellmembran des Herzmuskels. *Neunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path. Pharmak.* 245, 62-3 (1963)

51. Proctor, Ch. D.,
I. Rebar jr. und
B. Tigerman: A hypothesis for a mechanism of
cardiac glycoside action.
Ann. New York Acad. 62, 379-401
(1955)
52. Rabinovitz, M.,
M. E. Olson,
D. M. Greenberg: Independent antagonism of amino
acid incorporation into protein.
J. biol. Chem. 210, 837-49 (1954)
53. Rabinovitz, M.,
M. E. Olson und
D. M. Greenberg: Role of glutamine in protein
synthesis by the Ehrlich ascites
carcinoma.
J. biol. Chem. 222, 879-93 (1956)
54. Repke, K.: Verteilung, Ausscheidung und
Stoffwechsel von Digitoxin bei
der Ratte.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path.
Pharmak. 233, 271-83 (1958)
55. Repke, K.,
S. Kleszczewski und
L. Roth: Über Spaltung und Hydroxylierung
von Digitoxin bei der Ratte.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path.
Pharmak. 237, 34-48 (1959)
56. Ruzskowski, M.,
C. Arasimowicz,
J. Knispowski,
I. Steffen,
K. Weiss: Renal reabsorption of amino acids.
Amer. J. Physiol. 203, 891-6 (1962)
57. Schanker, L. S.: Absorption of drugs from the rat
colon.
J. Pharmacol. exp. Ther. 126, 283-90
(1959)
58. Schanker, L. S.,
P. A. Shore,
B. B. Brodie und
C. A. Hogben: Absorption of drugs from the rat
small intestine.
J. Pharmacol. exp. Ther. 123, 81-7
(1958)
59. Schanker, L. S.,
D. I. Tocco: Active transport of some pyrimidines
across the rat intestinal epithelium.
J. Pharmacol. exp. Ther. 128, 115-21
(1960)
60. Schatzmann, H. J.: Herzglykoside als Hemmstoffe für
den aktiven Kalium- und Natrium-
transport durch die Erythrocyten-
membran.
Helv. physiol. pharmacol. Acta 11,
346-54 (1953)
61. Schedl, H. P.,
J. A. Clifton: Small intestinal adsorption of
steroids.
Gastroenterology 41, 491-9 (1961)

62. Schwab, M.,
E. Göltner und
R. Koch: Der Einfluß von Digitalisglykosiden
auf die Plasmaelektrolyte und die
wasser- und Elektrolytausscheidung
der Niere bei Herzinsuffizienz.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 61, 491-4
(1955)
63. Siström, W. R.: On the physical state of the
intracellularly accumulates
substrates of B-galactoside-
permease in Escherichia coli.
Biochim. biophys. Acta, Amsterdam
29, 579-87 (1958)
64. Spencer, R. P.,
I. Weinstein,
A. Sussman,
T. M. Bow,
M. A. Markulis: Effect of structural analogues
on intestinal accumulation of
glycine.
Amer. J. Physiol. 203, 634-6 (1962)
65. Stanley, I.,
M. Reiter: Die Wirkung von Dihydro-Ouabain
auf die Aktionspotential-Dauer des
Meerschweinchenpapillarmuskels
bei verschiedenen Calcium- und
Natrium-Konzentrationen der Außen-
lösung.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path.
Pharmak. 247, 332-3 (1964)
66. Stowring, L.,
W. I. Bowen,
P. Mattingly und
M. Morales: On the mechanism of cardiac
glycoside action.
Circulat. Res. 19, 496-506 (1966)
67. Thomas, L. J. jr.: Increase of labeled calcium uptake
in heart muscle during potassium
lack contracture.
J. gen. Physiol. 43, 1193-1206 (1960)
68. Tuttle, R. S.,
P. N. Witt und
A. Farah: Therapeutic and toxic effects of
ouabain on K⁺ fluxes in rabbit
atria.
J. Pharmacol. exp. Ther. 137, 24-30
(1962)
69. Varga, E.,
D. Bagdy und
L. Kesztyüs: Die "cortinähnliche" Wirkung
des g-Strophenthins.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pat.
Pharmak. 207, 29-38 (1949)
70. Vogt, W.: Resorption von Pharmaka durch
Diffusion.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pat.
Pharmak. 250, 210-31 (1965)
71. Wilbrandt, W.,
R. Caviezel: Die Beeinflussung des Austritts
von Calcium aus dem Herzmuskel
durch Herzglykosid.
Helv. physiol. pharmacol. Acta 12,
C 40-2 (1954)

Herrn Prof. Dr. Neuhaus danke ich für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung während der Durchführung der Arbeit. Auch Herrn Dr. Ruiz-Torres möchte ich für seine große Hilfe danken.

Lebenslauf

Am 31.12.1936 wurde ich in Hamburg als Tochter des selbständigen Kaufmanns Dr. med. Georg Steindorff und seiner Ehefrau Gertrud geb. Meier geboren.

Von Ostern 1949 an besuchte ich eine wissenschaftliche Oberschule in Hamburg, die ich nach bestandenem Vorabitur im Frühjahr 1956 verließ, um den Beruf der medizinisch-technischen Assistentin zu erlernen. Nach zweijähriger Ausbildung an der Lehranstalt für medizinisch-technische Assistentinnen in Hamburg bestand ich im Oktober 1958 die staatliche Prüfung. Von November 1958 bis Juni 1963 arbeitete ich als medizinisch-technische Assistentin in einem wissenschaftlichen Laboratorium der Medizinischen Universitäts-Klinik Göttingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Südhof.

Am 31.10.1962 erwarb ich die Berechtigung zum Hochschulstudium durch den Niedersächsischen Prüfungsausschuß für die Zulassung zum Hochschulstudium ohne Reifezeugnis.

Das Medizinstudium begann ich in Göttingen im November 1962 und bestand am 2.3.1965 die ärztliche Vorprüfung. Anschließend studierte ich vier klinische Semester an der Freien Universität Berlin und kehrte zum Sommersemester 1967 nach Göttingen zurück. Am 27.6.1968 bestand ich die ärztliche Prüfung in Göttingen.

Seit dem 30.6.1967 bin ich mit dem Gerichtsassessor Dr. Detlef Schröder verheiratet.

